

果汁飲料中の酢酸- α -トコフェロールおよびトコフェロール同族体の同時分析

新 藤 哲 也*, 大 石 充 男*, 石 川 ふさ子*, 堀 江 正 男*,
安 井 明 子*, 荻 野 周 三**, 伊 藤 弘 一*

Simultaneous Determination of α -Tocopherol Acetate and Tocopherol Homologues in Juice

Tetsuya SHINDO*, Mitsuo OISHI*, Fusako ISHIKAWA*, Masao HORIE*,
Akiko YASUI*, Shuzo OGINO** and Koichi ITO*

A method for the simultaneous determination of α -tocopherol acetate (TocAc) and tocopherol (Toc) homologues (α , β , γ and δ -Toc) in juices using reversed-phase HPLC was developed. TocAc and Toc homologues were well separated on a C30 column with methanol as a mobile phase within 20 minutes at 5°C and monitored with a UV detector (281 nm) and fluorescence detector (ex. 298 nm, em. 325 nm). The extraction rates of TocAc and Toc homologues from juice with ethyl acetate were more than 97%. The content of TocAc in juice made in America by the proposed method was 270 $\mu\text{g/mL}$ in 2003. An analysis of 25 imported juice samples on the market revealed that only α -Toc was detected in 9 samples, and no TocAc, β , γ and δ -Toc were detected in these samples. This method is applicable to detect TocAc and Toc homologues in juice.

Keywords : 酢酸- α -トコフェロール α -tocopherol acetate, トコフェロール tocopherol, 果汁飲料 juice, 指定外添加物 non-permitted food additives, 輸入食品 imported foods, 高速液体クロマトグラフィー HPLC, トリアコンチルシリル化シリカゲルカラム C30, ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS

はじめに

酢酸- α -トコフェロール (TocAc) は α -トコフェロール (Toc) の誘導体であることから, 日本では医薬品として, ビタミン E 欠乏症の予防および治療や末梢循環障害, 過酸化脂質の増加防止等に用いられている¹⁾. また, 米国, 韓国, 中華人民共和国など多くの国々では栄養強化剤として, 種々の食品に使用されている²⁾ が, 我が国では食品への使用は許可されていない.

近年輸入食品の普及に伴い, 国内にかつて存在しなかった食品が多品種にわたり輸入されるようになった. このような食品から我が国において指定外の食品添加物が検出され, 違反となる事例がしばしば見受けられる.

著者らは平成 13 年に東京都内の食料品店で行政検体として収去された米国産の果汁飲料から, 指定外添加物である TocAc を検出したのに続き, 平成 15 年にも同銘柄の米国産果汁飲料から, 再び TocAc を検出した.

食品中の TocAc の分析法は HPLC を用いた方法³⁻¹³⁾ が多数報告されている. 今回 TocAc とともに添加される可能性のある α , β , γ , δ の 4 種のトコフェロール同族体の同時分析法をさらに改良すると同時に, 市販外国産飲料中の TocAc および 4 種の Toc 同族体の含有量実態調査を行ったので, 併せて報告する.

実験方法

1. 試料

平成 15 年に TocAc を検出した米国産果汁飲料, 平成 16 年 2~3 月, 東京都内のスーパーマーケットで市販されていた外国産飲料 25 検体を試料とした.

2. 標準品および試薬

1) 標準品 d - α -トコフェロール, d - β -トコフェロール, d - γ -トコフェロール, d - δ -トコフェロール (エーザイ(株)製), 酢酸 dl - α -トコフェロール (東京化成工業(株)製)

2) 標準原液および混合標準溶液 標準品約 20 mg をそれぞれ正確に量り, エタノール 20 mL に溶解したものを標準原液 (1000 $\mu\text{g/mL}$) とした. 各標準原液を用時エタノールで希釈して混合標準溶液を調製した.

エタノールおよびメタノールは HPLC 用, 酢酸エチルは特級品をそれぞれ用いた.

3. 装置

1) HPLC ポンプ: LC-6AD (島津製作所製), UV 検出器: UVIDEC-100-VI, 蛍光検出器: 820FP (以上

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター医薬品部

日本分光工業(株製)

- 2) GC/MS GC-17A/QP5000 (株島津製作所製)
- 3) 低温恒温槽 Personal Lt-10F (TAITEC 社製)
- 4) 振とう器 SR-2w (TAITEC 社製)

4. 試験溶液の調製

試料約 5 g をビーカーに精密に量り、水 50 mL で洗いながら分液漏斗に入れた。100 mL の酢酸エチルを加えた後、5 分間振とうした。酢酸エチル層を分取し、酢酸エチル 100 mL でさらに 2 回抽出を繰り返した。全酢酸エチル層を合わせ、水 20 mL で洗浄した。酢酸エチル層を三角フラスコに移し、無水硫酸ナトリウムを加えて 30 分間放置した。ろ紙 (TOYO No.5A) をろ過後、40℃で減圧乾固した。残留物をエタノール 5 mL で溶解後、0.45 μ m メンブランフィルターでろ過したものを HPLC および GC-MS 用試験溶液とした。

5. HPLC 条件

カラム: Develosil C30-UG-5 3.0 mm i.d.×250 mm (野村化学(株)製), 移動相: メタノール, 流速: 0.8 mL/min, カラム温度: 5℃, 検出波長: UV281 nm, 蛍光 ex. 298 nm, em. 325 nm, 注入量: 20 μ L

6. GC/MS 条件

カラム: DB-5MS 0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 μ m (J & W 社製), カラム温度: 100℃ → (20℃/min) → 310℃ (10 min), 注入口温度: 250℃, インターフェース温度: 280℃, キャリヤーガス: ヘリウム, 流速: 1.4 mL/min, 注入方法: スプリットレス, 注入量: 2 μ L, イオン化: EI, スキャン: m/z 40-500

結果及び考察

1. HPLC 条件

分析カラムには衛生試験法・注解 2000⁹⁾ で採用されている ODS 系の逆相分配カラムを用いて HPLC 分析を行ったところ、 β -Toc と γ -Toc の分離が不十分であった。そこで、トリアコンチルシリル化シリカゲル (C30) カラムを用いた β -Toc と γ -Toc の比較的良好な分離が得られる Strohschein らの方法¹¹⁾ を用いることとした。カラムに C30 カラム, 移動相にメタノールを用いて 20℃で分析を行った結果、 β -Toc と γ -Toc の分離は不完全であった。そこで、カラム温度を 5~20℃まで変化させたところ、Fig. 1 に示したようにカラム温度が低くなるにしたがって、 β -Toc と γ -Toc の分離が良好となり、5℃で完全に分離した。このことから、今回の分析はカラム温度を 5℃で行うこととした。

2. 再現性および検出限界

TocAc と Toc 同族体, それぞれ 20 μ g/mL の 5 種混合溶液を分析したときの保持時間の変動係数 (C.V., $n=5$)

は UV 検出器では 0.1% 以下, 蛍光検出器では 0.4% 以下であり, 面積値の C.V. ($n=5$) は UV 検出器では 1.9% 以下, 蛍光検出器では 2.0% 以下と良好であった。

本法における TocAc の検出限界 ($S/N=3$) は UV 検出器では 1 μ g/mL, 蛍光検出器では 5 μ g/mL であり, UV 検出器の方が高感度であった。一方, Toc 同族体の検出限界は α -Toc が 0.5 μ g/mL (UV 検出器) および 0.1 μ g/mL (蛍光検出器), β , γ , δ -Toc が 0.2 μ g/mL (UV 検出器) および 0.02 μ g/mL (蛍光検出器) であった。Toc 同族体では蛍光検出器の方が 5~10 倍高感度であった。

TocAc の検量線は 1~500 μ g/mL (UV 検出器) の範囲で直線性が得られた (相関係数 = 0.9995)。 α -Toc は 0.1~20 μ g/mL (蛍光検出器), β , γ , δ -Toc はいずれも 0.02~2 μ g/mL (蛍光検出器) の範囲で直線性が得られた (相関係数はいずれも 0.999 以上)。

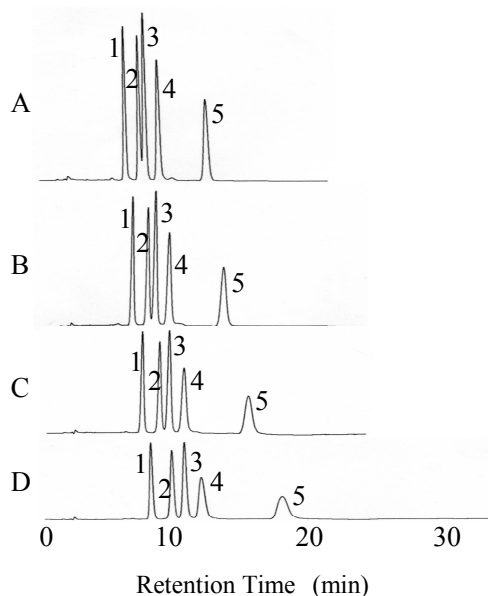


Fig. 1. HPLC Chromatograms of TocAc and Toc Homologues with a Column Temperature of (A) 20℃; (B) 15℃; (C) 10℃ and (D) 5℃

Mobile phase: methanol, detector: UV281nm

1: δ -Toc, 2: γ -Toc, 3: β -Toc, 4: α -Toc, 5: TocAc, each 20 μ g/mL

3. 抽出溶媒

食品からの 4 種の Toc 同族体の抽出については、ケン化後に溶媒抽出を行う方法が数例¹⁴⁻¹⁷⁾ 報告されているが、TocAc および 4 種の Toc 同族体の 5 種を同時に抽出した報告はほとんどみあたらない。そこで、今回の試料は飲料であることから、直接溶媒で抽出する簡便な方法について検討を行った。

あらかじめ TocAc, Toc 同族体を含有していないことを確認した果汁飲料に TocAc, Toc 同族体をそれぞれ 100 μ g/g になるように同時に添加し、酢酸エチル, ジエチルエーテル, クロロホルム, n -ヘキサン 100 mL で

それぞれ3回抽出を行った。その結果、Table 1に示したように酢酸エチルを用いた場合が最も抽出率が良く、いずれも97%以上であった。また、C.V.も1.8%以下と

良好であった。これらのことから抽出溶媒には酢酸エチルを用いることとした。

Table 1. Rates of Extraction of TocAc and Toc Homologues from Juice with Organic Solvent

Solvent	Extraction rates, % (% C.V.)				
	TocAc	α -Toc	β -Toc	γ -Toc	δ -Toc
Ethyl acetate	98.4 (1.0)	99.4 (1.3)	97.9 (1.2)	98.0 (1.8)	97.6 (1.4)
Diethyl ether	83.4 (4.5)	80.7 (4.3)	81.6 (3.8)	81.4 (4.3)	81.3 (3.9)
Chloroform	78.5 (5.6)	78.1 (6.7)	77.7 (6.3)	77.7 (6.0)	77.4 (6.2)
<i>n</i> -Hexane	47.6 (19.0)	47.5 (19.8)	47.2 (19.6)	47.1 (19.4)	47.0 (19.4)

Added : 100 μ g/g, n=5

4. 米国産果汁飲料の分析

本法を用いて、平成15年にTocAcを検出した米国産果汁飲料中のTocAcおよびToc同族体の分析を行った。米国産果汁飲料中のTocAc含有量は270 μ g/gで、平成13年に検出された飲料中の含有量(300 μ g/g)とほぼ同程度であった。4種のToc同族体はいずれも検出されなかった。HPLCクロマトグラムはFig. 2に示したように妨害ピークがなく、良好であった。また、TocAcを確認するため、GC/MSによる分析を行った。GC/MS分析はGonzálezらの方法¹⁸⁾に準じたところ、分析に25分を要した。そこで、分析時間を短縮するため昇温速度を2倍にしたところ、Fig. 3に示したように15分以内で分析することができ、TocAcおよびToc同族体の分離も良好であった。米国産果汁飲料中TocAcのGC/MSクロマトグラムにおける保持時間(Fig. 3)およびスペクトルパターン(Fig. 4)はTocAc標準溶液とよく一致したことから、TocAcと同定した。なお、GC/MS分析における確認限度はTocAcが2 μ g/mL、 α 、 β 、 γ 、 δ -Tocがいずれも1 μ g/mLであった。

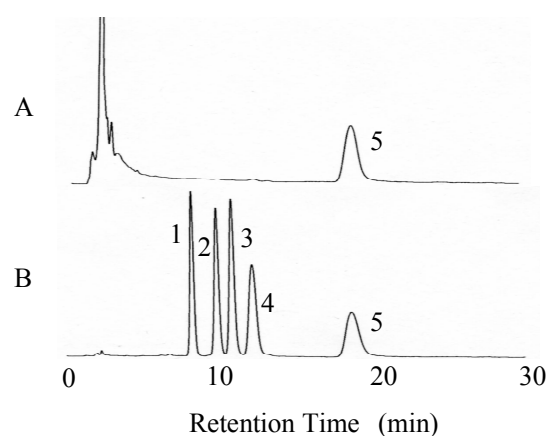


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Juice Containing TocAc (A) and Standards (B)

Detector: UV281nm

1: δ -Toc, 2: γ -Toc, 3: β -Toc, 4: α -Toc, 5: TocAc, each 20 μ g/mL

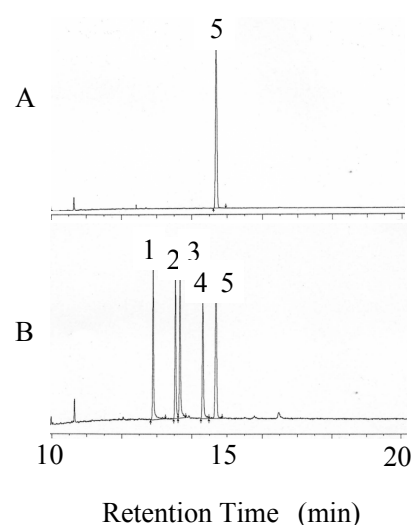


Fig. 3. GC/MS Chromatograms of Juice Containing TocAc (A) and Standards (B)

1: δ -Toc, 2: γ -Toc, 3: β -Toc, 4: α -Toc, 5: TocAc, each 20 μ g/mL

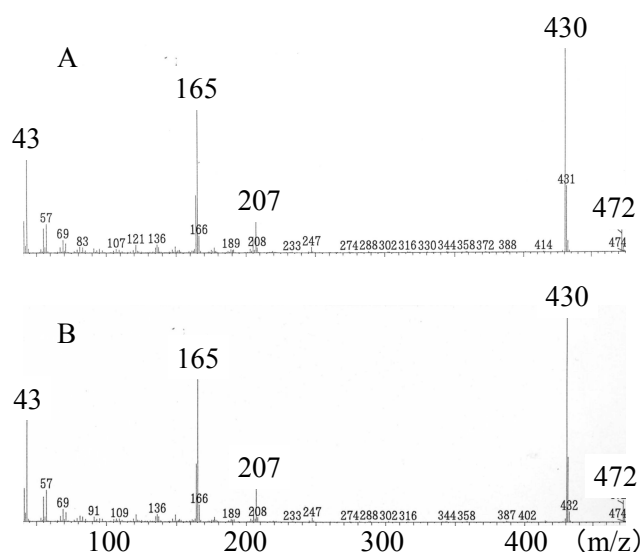


Fig. 4. GC/MS Spectra of Juice Containing TocAc (A) and Standard (B)

Table 2. Concentrations of TocAc and Toc Homologues in Juices ($\mu\text{g/g}$)

No.	Sample	Origin	TocAc	α -Toc	β -Toc	γ -Toc	δ -Toc
1	Lemon juice	Italy	N.D.	3.7	N.D.	N.D.	N.D.
2	Mango juice	Taiwan	N.D.	3.4	N.D.	N.D.	N.D.
3	Mango juice	Cuba	N.D.	2.5	N.D.	N.D.	N.D.
4	Mango juice	Vietnam	N.D.	1.3	N.D.	N.D.	N.D.
5	Mango juice	Korea	N.D.	1.2	N.D.	N.D.	N.D.
6	Tomato juice	U.S.A.	N.D.	2.6	N.D.	N.D.	N.D.
7	Orange juice	Taiwan	N.D.	1.9	N.D.	N.D.	N.D.
8	Orange juice	U.S.A.	N.D.	0.8	N.D.	N.D.	N.D.
9	Grapefruit juice	Australia	N.D.	1.2	N.D.	N.D.	N.D.
10	Aloe juice	Korea	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	Apple juice	U.S.A.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	Caju juice	Tailand	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
13	Coconut juice	Tailand	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
14	Coconut juice	China	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
15	Energy drink	Austria	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16	Energy drink	Korea	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17	Energy drink	U.S.A.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	Fruit mix juice	U.S.A.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
19	Fruit mix juice	South Africa	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	Guava juice	Egypt	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
21	Guava juice	Vietnam	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
22	Hibiscus juice	Malaysia	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
23	Orange juice	Korea	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
24	Peach tea	Philippines	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
25	Starfruit juice	Taiwan	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: $<5 \mu\text{g/g}$ (TocAc), $<0.5 \mu\text{g/g}$ (α -Toc), $<0.2 \mu\text{g/g}$ (β , γ , δ -Toc)

5. 市販飲料の含有量調査

本法を用いて、市販外国産飲料 25 検体について、TocAc および Toc 同族体の分析を行った (Table 2)。市販飲料からはいずれも TocAc は検出されなかった。 α -Toc は 25 検体中 9 検体から検出され、 β , γ および δ -Toc は検出されなかった。市販飲料中の α -Toc 含有量は $0.8 \sim 3.7 \mu\text{g/g}$ とわずかであり、マンゴー、レモン等の果汁に数 $\mu\text{g/g}$ 程度含まれている¹⁹⁾ことから、これら 9 検体中の α -Toc は天然由来であると推察された。 α -Toc を検出したイタリア産レモンジュース (No.1) の HPLC クロマトグラムを Fig. 5 に示した。以上の結果、本法を用いることにより市販果汁飲料中の TocAc および Toc 同族体を精度良く分析することが可能であった。

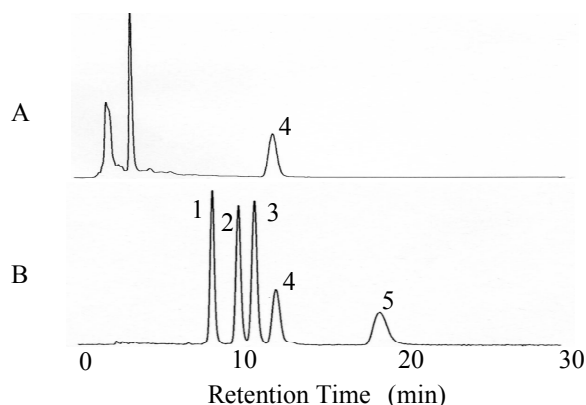


Fig. 5. HPLC Chromatograms of Juice (No.1) containing α -Toc (A) and Standards (B)

Detector: fluorescence ex.298nm, em.325nm

1: δ -Toc, 2: γ -Toc, 3: β -Toc, 4: α -Toc, each $5 \mu\text{g/mL}$

5: TocAc $400 \mu\text{g/mL}$

ま と め

東京都内で平成 13 年および 15 年の 2 回にわたり、米国産果汁飲料から TocAc を検出したことを受けて、TocAc および、同時に添加される可能性のある α , β , γ , δ の 4 種の Toc 同族体の同時分析法を検討し、市販外国産飲料中の含有量調査を行った。

カラムに C30 カラム、移動相にメタノールを用い、カラム温度を 5°C に設定することにより、TocAc および Toc 同族体を 20 分以内に良好に分離することができた。果汁飲料からの TocAc および Toc 同族体の抽出は酢酸エチルを用いた場合が最も抽出率が良く、いずれも 97% 以上であった。米国産果汁飲料中の TocAc 含有量は $270 \mu\text{g/g}$ (平成 15 年) であった。市販外国産飲料 25 検体の調査では TocAc は検出されず、 α -Toc が 9 検体から検出された。本法により市販果汁飲料中の TocAc および Toc 同族体を精度良く分析することができた。

文 献

- 1) 日本薬局方解説書編集委員会編：第十五改正 日本薬局方解説書, C-2705-2709, 2006, 廣川書店, 東京.
- 2) 日本食品添加物協会編：世界の食品添加物概説, 98, 115, 372, 2004, 日本食品添加物協会, 東京.
- 3) Chase, G. W., Eitenmiller, R.R. and Long, A.R. : *J. AOAC Int.*, **82**(2), 271-275, 1999.
- 4) Ye, L., Landen, W. O. and Eitenmiller, R.R. : *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4003-4008, 2000.
- 5) Ye, L., Landen, W. O. and Eitenmiller, R.R. : *J. Food Sci.*,

- 66(1), 78-82, 2001.
- 6) Weinmann, A. R. M., Oliveira M. S., Jorge, S.M., *et al.* : *J. Chromatogr. B*, **729**, 231-236, 1999.
- 7) Rupérez, F. J., Barbas, C., Castro, M., *et al.* : *J. Chromatogr. A*, **839**, 93-99, 1999.
- 8) Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R.M., *et al.* : *J. Chromatogr. A*, **881**, 251-254, 2000.
- 9) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2000, 675-676, 2000, 金原出版, 東京.
- 10) 寺田久屋, 田村征男：食衛誌, **45**(6), 289-294, 2004.
- 11) Strohschein, S., Pursch, M., Lubda, D., *et al.* : *Anal. Chem.*, **70**(1), 13-18, 1998.
- 12) Lienau, A., Glaser, T., Krucker, M., *et al.* : *Anal. Chem.*, **74**(20), 5192-5198, 2002.
- 13) Krucker, M., Lienau, A., Putzbach, K., *et al.* : *Anal. Chem.*, **76**(9), 2623-2628, 2004.
- 14) 吉田俊一, 小塚信一郎, 花井潤師, 他：札幌市衛研年報, **9**, 81-85 1981.
- 15) Hogarty, C. J., Ang, C. and Eitenmiller, R. R. : *J. Food Compos. Anal.*, **2**(3), 200-209, 1989.
- 16) 氏家隆, 武山哲茂, 近藤あゆみ, 他：ビタミン, **65**(8), 393-397, 1991.
- 17) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2000, 211-213, 2000, 金原出版, 東京.
- 18) González, M., Gallego, M. and Valcárcel, M. : *J. Chromatogr. A*, **848**, 529-536, 1999.
- 19) 伊藤三郎編：果実の科学, 53-54, 1995, 朝倉書店, 東京.